

福井大学平成22年度重点研究 「競争的配分経費（若手研究者支援）」 FILIP、FILIP 相同分子による細胞骨格の調節機構の検討

研究代表者： 八木 秀司（医学部・准教授）

概 要	
	FILIP は当教室でアクチン結合蛋白質 Filamin A と結合し、細胞内のアクチン線維の動態を制御することを報告してきた分子である。FILIP には2つの相同分子が存在し、FILIP の機能を補完している可能性を考え、FILIP およびその相同分子の機能解析を行ってきた。この FILIP および相同分子の機能解析でミオシンの一つと結合していることを見いだした。さらにこのミオシンの機能に重要なミオシンヘッドドメインが存在する N 端にこれらの分子が結合し、機能を調節している可能性を見いだした。また、FILIP 遺伝子欠損マウスでは神経細胞の棘突起の形態異常を見だし、FILIP が生体内でミオシンの機能調節を通じ細胞の形態調節を行っている可能性を示した。
関連キーワード	アクチン、ミオシン、細胞骨格、神経細胞、棘突起

研究の背景および目的

当教室ではアクチン結合蛋白質 Filamin A と結合し、その分解を通じて、細胞内のアクチン線維の動態を制御している分子 FILIP の解析を行ってきた。FILIP は中枢神経系の発生場である脳室帯に発現し、Filamin A の機能を調節することで、神経細胞の移動制御に関わることを、当教室で明らかにしてきた (Nagano *et al.* Nat Cell Biol, 4, 495, 2002)。我々は、FILIP の機能解析をさらに進めるため、FILIP 遺伝子欠損マウスを作製し、その表現型を検討してきた。しかしながら、FILIP の機能として予想された神経系の表現型とは異なる結果を得た。この理由の一つとして、FILIP に相同性の高い二つの相同分子が FILIP 欠損に関して機能を補完している可能性があると考えた。また、Filamin A は胎生期の脳には豊富に存在するが、成体になると発現量は低下していることが知られている (Sheen *et al.* Hum Mol Genet, 11, 2845, 2002)。私たちは、Filamin A の発現量が低下している成体の脳内に、FILIP が存在することを見いだした。以上より、我々は FILIP と FILIP 相同分子に Filamin A 以外の共通の結合分子が存在し FILIP および FILIP 相同分子の機能に大きく関わっている可能性を考え、候補分子を検索した。そ

の結果、FILIP と FILIP 相同分子の一つにミオシンファミリー分子の一つが結合することを見いだした。この結合するミオシンは細胞の移動調節、細胞接着、細胞分裂に関わる多機能な分子であり、多彩な細胞に発現している。また、この FILIP および FILIP 相同分子の一つが結合するミオシンは、通常のミオシンと構造および機能が似ており、アクチン線維と結合およびアクチン線維上をスライドするための ATP を分解する ATPase 活性を有するミオシンヘッドドメインを有している (Vinciente-Manzanares *et al.* Nat Rev Mol Cell Biol, 10, 778, 2009)。さらに、この結合するミオシンは、中枢神経系での発現が高いことが知られている。我々はこのミオシンとの結合を介して、FILIP および FILIP 相同分子が中枢神経系での細胞骨格の調節を行っている可能性を考え、FILIP の成体脳内での機能にこのミオシンとの結合が重要な役割を果たしている可能性が高いと考えた。そこで FILIP および FILIP 相同分子による新たな細胞骨格の調節機構を明らかにし、その生体内での意義を検討することを目的として、今回の実験を計画した。

研究の内容および成果

1) ミオシンに対する FILIP と FILIP 相同分子の結合部位の検索

ミオシンと FILIP、FILIP 相同分子のそれぞれの結合部位を免疫沈降法により探索した。各種 FILIP の断片を発現するベクターを COS-7 細胞に導入し、内在性のミオシンが免疫沈降法で共沈するか検討した。FILIP ではドメインとして coiled-coil domain を中心とした SMC ドメインを

分子の中央に有し、C 末側に Herpes_BLLF1 ドメインを有していることが CDD のデータベース検索で判明している。今回の検索では、ミオシンとの結合は FILIP のこれらのドメインと関係がないことが明らかになった。また、ミオシンの変異分子と FILIP または FILIP 相同分子を COS-7 細胞に発現させ、免疫沈降法で結合を検討した結果、FILIP、FILIP 相同分子ともにミオシンのミオシン

ヘッドドメインの N 端側に結合する可能性が高いことを見いだした。

2) 神経細胞における FILIP 欠損とその異常

FILIP と結合するミオシンは、発生期の中樞神経系の発達に関わり、発生後では神経細胞の樹状突起のシナプス形成部位である棘突起の形態に関わっていることが報告されている。その報告ではミオシンの発現量を低下させると棘突起が長くなることが観察されている(Ryu *et al.* Neuron, 49, 175, 2006)。FILIP がミオシンを介して神経細胞内の棘突起で機能しうるか検討する目的で、内在性の FILIP の発現を認めない海馬神経細胞を用いて検討した。培養海馬神経細胞に培養開始 20 日目に FILIP 発現ベクターを導入し、2 日後に FILIP の細胞内分布を検討した。その結果、FILIP は神経細胞の樹状突起および棘突起に分布していた。また、FILIP が神経細胞に及ぼす影響を検討する目的で、培養 17 日目の海馬神経細胞に FILIP 発現ベクターを導入し、培養 21 日目に神経細胞の形態を観察した。この結果、FILIP は神経細胞の棘突起の形態に影響を及ぼすことを明らかにした。さらに、FILIP 遺伝子欠損マウスの神経細胞の形態を検討した。FILIP の発現が認められる成体の脳の梨状葉の神経細胞の形態をゴルジ染色法により検討した。その結果、FILIP 遺伝子欠損マウスでは正常コントロールマウスと比較すると、棘突起が短縮していることを認めた (図 1)。

FILIP は脳室帯の細胞に発現しており、その機能は細胞移動に関わることが知られている。以前まで、我々は神経細胞移動の検討を行う場合に蛍光蛋白質を発現するベクターを胎生 14 日の脳室帯の細胞に子宮内電気穿孔法を用いて導入し、胎生 17 日もしくは 18 日に蛍光蛋白質を発現している細胞の分布を検討してきた。この検討では FILIP

遺伝子欠損マウスにおいて、正常コントロールと比較して有意な異常を認めなかった。しかしながら、この手法では大きな異常以外は検出できない可能性があると考えた。そこで、今回、観察を行う時期を変更して検討することとした。胎生 14 日に子宮内電気穿孔法で蛍光蛋白質を発現するベクターを導入した脳室帯由来の細胞の分布を生後 3 週に検討した。その結果、FILIP 遺伝子欠損マウスとそのコントロールマウスの間に有意な差を認めた。また、この異常は、大脳皮質の投射神経のうち反対側の大脳皮質に投射する神経細胞においても認められており、投射神経細胞の位置異常をきたしていると考えられた。

以上の結果は、FILIP 欠損の影響が大脳皮質の層構造の形成に関わっていることを示している。棘突起の異常とこの皮質の形成異常が、以前に観察した、皮室内の興奮伝播の異常の原因であると考えられた。

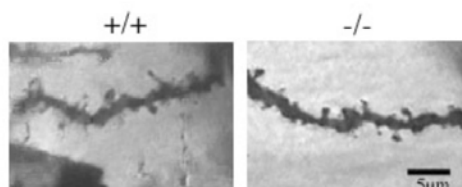


図 1. FILIP 遺伝子欠損マウスの神経細胞に認めた棘突起の変化

ゴルジ染色法を用いて観察した神経細胞の樹状突起上の棘突起を示す。+/+: 正常同腹マウス、-/-: FILIP 遺伝子欠損マウス

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

Takabayashi, T, Xie, MJ, Takeuchi, S, Kawasaki, M, Yagi, H, Okamoto, M, Tariqur, RM, Malik, F, Kuroda, K, Kubota, C, Fujieda, S, Nagano, T, Sato, M. LL5beta directs the translocation of filamin A and SHIP2 to sites of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PtdIns(3,4,5)P3) accumulation, and PtdIns(3,4,5)P3 localization is mutually modified by co-recruited SHIP2. J Biol Chem 2010;285(21):16155-65.

(学会発表)

Hideshi Yagi, Min-Je Xie, Hiroshi Ikeda, Munekazu Komada, Tokuichi Iguchi, Kazuki Kuroda, Masaru Okabe, Makoto Sato
Novel role of FILIP: Deletion of FILIP changes spine morphology of a neuron in the piriform cortex (第 116 回 日本解剖学会総会・全国学術集会)

「特記事項」

本研究に関しまして、本教室の佐藤真教授、また、他の教室の皆様の様々なご指導、御協力をいただきました。この場をお借りいたしまして、お礼申し上げます。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・科学研究費補助金・基盤研究 (C)・平成 22 年度・神経発生時の細胞増殖・細胞移動に関わる分子の蛋白分解による機能発現調節機構の探究・代表・110 万円

申請中

日本学術振興会・科学研究費補助金・基盤研究 (C)・平成 23-25 年度・神経細胞内ミオシン機能の新規制御機構の解明・代表・未定
文部科学省・科学研究費補助金・新学術領域研究・公募研究・平成 23 年度・神経細胞移動の場と移動停止機構の解析・代表・未定